

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



| | |
|-------------------|-----|
| FR 00/1725 | |
| 207018786 | |
| REC'D 23 AUG 2000 | |
| WIPO | PCT |

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 30 JUIN 2000

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cédex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30



BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITE

Code de la propriété intellectuelle-Livre VI

cerfa
N° 55 -1328

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES **22 JUIN 1999**
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL **9907963**
DÉPARTEMENT DE DÉPÔT **75 INPI PARIS**
DATE DE DÉPÔT **22 JUIN 1999**

1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

CABINET LAVOIX
2 Place d'Estienne d'Orves
75441 PARIS CEDEX 09

R 99073

n° du pouvoir permanent **BFF 99/0315** références du correspondant **53-20-14-20** téléphone

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention ☐ demande divisionnaire
☐ certificat d'utilité ☐ transformation d'une demande de brevet européen ☐ demande initiale
☐ brevet d'invention

Établissement du rapport de recherche

☐ différé ☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

☐ oui ☐ non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

Nouvelles souches bactériennes, notamment de Xanthomonas, en particulier Xanthomonas campestris.

3 DEMANDEUR (S) n° SIREN code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

Forme juridique

RHODIA CHIMIE

Nationalité (s) **Française**

Adresse (s) complète (s)

Pays

25, Quai Paul Doumer 92408 COURBEVOIE CEDEX

FR

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

☐ oui ☒ non Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

☐ requise pour la 1ère fois ☐ requise antérieurement au dépôt ; joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

(nom et qualité du signataire)

CABINET LAVOIX
M. MONCHENT n° 92.1179

M. Monchenty

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

[Signature]

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

DEPARTEMENT DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg

75800 Paris Cédex 08

Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

99 07963

TITRE DE L'INVENTION : **Nouvelles souches bactériennes, notamment d**
Xanthomonas, en particulier Xanthomonas campestris.

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

RHODIA CHIMIE

25, Quai Paul Doumer 92408 COURBEVOIE CEDEX FRANCE

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

PIERRARD Jérôme
3, rue Hector Berlioz
69009 LYON FRANCE

SIMON Jean-Luc
4, route de Limoges
79500 MELLE FRANCE

CHEVALLEREAU Paule
Rue Eloi Ricard
79500 MELLE FRANCE

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

Paris , le 26 octobre 1999

CABINET LAVOIX
M. MONCHENY n° 92.1179

N. Monchény

DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS

| PAGE(S) DE LA DESCRIPTION OU DES REVENDECATIONS OU PLANCHE(S) DE DESSIN | | | R.M.* | DATE DE LA CORRESPONDANCE | TAMPON DATEUR DU CORRECTEUR |
|--|--------------|------------|-------|---------------------------------|-----------------------------------|
| Modifiée(s) | Supprimée(s) | Ajoutée(s) | | | |
| 19, 20, 21 8 | 1 | | X | 10.01.00 10.01.00 | 20.01.00 - VD 2.01.00 - VD |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article R.612-36 du code de la Propriété Intellectuelle, est signalé par la mention «R.M.» (revendications modifiées).

L'invention a pour objet de nouvelles souches bactériennes, notamment de *Xanthomonas*, en particulier *Xanthomonas campestris* ayant perdu le caractère phytopathogène mais ayant sensiblement conservé la capacité de production d'exopolysaccharide, notamment de gomme xanthane.

Xanthomonas campestris pv. *campestris* est une bactérie Gram-négative phytopathogène des Crucifères utilisée pour la production industrielle de gomme xanthane (Martin, 1994, Res. Microbiol. 145 :9 93-97).

L'importance économique de cet exopolysaccharide a suscité de nombreuses études sur les gènes impliqués dans cette synthèse (Martin, 1994, précité).

De nombreux déterminants de la pathogénicité ont été décrits (Dow et Daniels, 1994, In Bacterial pathogenesis of plants and animals, JL Dangl, ed. Springer Verlag, Heidelberg). Parmi eux, se trouvent des enzymes extracellulaires à activité hydrolytique sur les tissus végétaux. Lorsque le système de sécrétion responsable de l'export de ces enzymes est inactivé, les souches de *X. campestris* ont un phénotype non phytopathogène associé à des symptômes des plantes très réduits (Dow et Daniels, 1994, précité). Parmi les déterminants de la pathogénicité décrits se trouve l'exopolysaccharide, qui semble avoir un rôle dans la phase précoce de la maladie (Dow et Daniels, 1994, précité ; Katzen et al., 1998, J. Bacteriol. 180 : 1607-1617). De même, un gène *hrpXc*, décrit chez *X. campestris* pv. *campestris* (Kamoun et al., 1992, Mol. Plant Microbe Interact. 5 : 22-33), est impliqué dans la suppression des réponses de défense de la plante hôte compatible, puisque sa mutation entraîne une réaction nécrotique caractéristique (réponse d'hypersensibilité, HR). Les gènes d'avirulence décrits chez les différents pathovars de *X. campestris* sont aussi impliqués dans la pathogénicité de la bactérie puisqu'ils sont reconnus par la plante possédant le gène de résistance correspondant et conduisent à une réaction HR (Dow et Daniels, 1994, précité ; Yang et al., 1995, Mol. Plant Microbe Interact. 8 : 627-631). Parmi les autres gènes impliqués dans la pathogénicité des *Xanthomonas* (Dow et Daniels, 1994, précité), ont été décrits deux gènes chez *X. campestris* pv *campestris* dont des mutations conduisent à une pathogénicité réduite sans modifications des niveaux d'accumulation d'enzymes extracellulaires et d'exopolysaccharides

(Osbourn *et al.*, 1990, Mol. Plant Microbe Interact. 3 : 280-285). D'autres déterminants de la pathogénicité sont constitués par différents jeux indépendants de gènes régulateurs de la synthèse des enzymes extracellulaires et de l'exopolysaccharide parmi lesquels on trouve : les gènes *rpfA* à *H*, dont des mutations conduisent à une réduction de la production d'exopolysaccharide ; *rpfN*, un represseur de la synthèse de ces enzymes et de l'exopolysaccharide ; *clp*, dont des mutations conduisent à une pathogénicité réduite et à une moindre production d'exopolysaccharides (Dow et Daniels, 1994, précité). Enfin, d'autres déterminants de la pathogénicité sont constitué par les gènes *hrp*.

Les gène *hrp* (réaction d'hypersensibilité et pathogénicité) sont essentiels pour la pathogénicité sur plante compatible et pour la réaction d'hypersensibilité sur les hôtes résistants (Alfano et Collmer, 1997, J. Bacteriol. 179 : 5655-5662). Ils ont été clonés et caractérisés à des degrés divers chez plusieurs bactéries phytopathogènes des genres *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Ralstonia* et *Xanthomonas* où ils sont relativement conservés (Zurek et Bukowski, 1998, Acta Microbiologica Polonica, 47 : 227-241 ; Alfano et Collmer, précité), en particulier chez *X. campestris* pv. *vesicatoria* (Huguet *et al.*, 1998, Molec. Microbiol 29 : 1379-1390 ; Fenselau *et al.*, 1992, Molecular Plant-Microbe Interactions, 5 : 390-396 ; Bonas, 1994, précité). Les plus conservés d'entre eux ont d'ailleurs été renommés gènes *hrc* (Bogdanove *et al.*, 1996, Mol. Microbiol., 20 : 681-683). Parmi les fonctions des gènes *hrp* décrites à ce jour se trouvent la régulation de leur expression, la production de protéines élicitrices de la réponse de l'hôte, la constitution d'un système de sécrétion spécifique (dit de type III) et la synthèse de glucanes periplasmiques (Zurek et Bukowski, 1998, Acta Microbiologica Polonica, 47 : 227-241 ; Mudgett et Staskawicz, 1998, Current Opinion in Microbiology 1 : 109-114 ; Lindgren, 1997, Annu Rev. Phytopathol. 35 :129-152 ; Alfano et Collmer, 1997, précité ; Bonas, 1994, précité). Un ensemble de gènes *hrp* a été cloné chez *X. campestris* pv. *campestris* (Arlat *et al.*, 1991, Mol. Plant Microbe Interact 4 : 593-601) mais non séquencé. Il est aussi rapporté que les souches porteuses de mutations dans ces gènes réalisées à l'aide d'un transposon auraient une production normale d'exopolysaccharide d'après l'aspect des colonies sur

boite. Aucune quantification plus précise de la productivité de xanthane de ces souches n'a toutefois été publiée.

En outre, les mutations réalisées chez ces souches ne possèdent pas un caractère de stabilité suffisant pour une utilisation industrielle pour la production de gomme xanthane. En effet, le transposon utilisé contient le gène codant pour la transposase (Simon *et al.*, 1989, Gene 80 : 161-169) ce qui n'exclue pas un événement d'excision du transposon à une fréquence pouvant être estimée entre 10^{-6} et 10^{-3} par génération (Berg *et al.*, 1989, In Berg and Howe ed., Mobile DNA, American Society for Microbiology, Washington, D.C. pp 879-926 ; Craig, In *Escherichia coli* and *Salmonella*, Neidhardt ed., ASM Press, Washington, D.C. pp 2339-2362). De plus, le transposon utilisé contient un gène de résistance aux antibiotiques néomycine et kanamycine. Enfin, le transposon inséré dans le génome de ces souches constitue un élément d'ADN non homologue puisque celui-ci n'est pas un élément naturel du génome de la souche utilisée.

Bien qu'il n'existe pas de réglementation spécifique à l'heure actuelle en Europe imposée par le caractère phytopathogène de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, il est hautement souhaitable, pour des raisons liées à l'environnement, d'utiliser des souches de *Xanthomonas campestris* non phytopathogènes, afin de diminuer le risque éventuel de contamination de cultures d'intérêt agronomique à proximité du site. La sélection d'une telle souche par les techniques classiques de mutagenèse aléatoire de production est un processus long et fastidieux puisqu'il doit faire intervenir un criblage à haute capacité permettant d'isoler une souche non phytopathogène mais ayant conservé ses caractéristiques de productivité, c'est-à-dire sans mutations secondaires.

Par ailleurs, l'utilisation d'une souche génétiquement modifiée produisant une gomme xanthane modifiée (telle que décrite dans US 5,514,791) ou ayant une productivité améliorée est soumise à une réglementation stricte (Theilleux 1998, Dictionnaire permanent Bioéthique et Biotechnologies, ed Législatives, pp 1595-1648). Celle-ci impose notamment pour une construction réalisée dans une souche présentant un danger pour les plantes, d'adopter des mesures de confinement sévères sur le site de

production. Les investissements nécessaires auraient alors des conséquences économiques négatives.

Il existe par conséquent un besoin de disposer d'une souche industrielle de *X. campestris* stablement dépourvue de caractère
 5 phytopathogène mais ayant retenu ses propriétés de productivité de gomme xanthane. De plus, pour des raisons réglementaires et afin de simplifier le traitement des déchets issus de la séparation de la gomme xanthane de la biomasse, il est utile que la souche ne contienne pas de gène hétérologue codant pour une résistance à un antibiotique. Enfin, au regard des législations
 10 française et européenne, il est préférable que la souche obtenue ait été construite par autoclone, ce qui signifie qu'elle ne contienne pas d'éléments d'ADN étranger à son patrimoine génétique naturel.

Les travaux des inventeurs ont permis la construction d'une souche de *X. campestris* possédant les propriétés requises.

15 De manière surprenante, il a été montré grâce à l'invention qu'une bactérie devenue non phytopathogène de manière stable, par délétion d'un fragment de taille importante affectant plusieurs kilobases de gènes impliqués dans la virulence, était néanmoins capable de produire de la gomme xanthane.

20 De manière plus surprenante encore, la souche modifiée de l'invention produit de la gomme xanthane en une quantité et une qualité en tous points comparables à celle produite par la souche sauvage à partir de laquelle la construction a été réalisée.

25 L'invention a pour objet une souche bactérienne ayant perdu le caractère phytopathogène par inactivation d'au moins un gène de virulence et ayant conservé la capacité de production d'exopolysaccharide.

La souche bactérienne selon l'invention est avantageusement rendue stablement non phytopathogène par délétion d'au moins un gène, avantageusement au moins deux gènes, de préférence au moins trois gènes
 30 du groupe de gènes *hrp* ou *hrc*, et de préférence 5 à 9 gènes du groupe de gènes *hrp* ou *hrc*.

Par "stablement dépourvue de caractère phytopathogène", on entend que ce caractère est conservé après un nombre de cycles cellulaires

d'au moins 20 générations, avantageusement d'au moins 30 générations, de préférence d'au moins 40 générations.

Parmi les bactéries ayant perdu leur caractère phytopathogène et avantageusement utilisables pour une production industrielle d'exopolysaccharide, on peut citer en particulier les genres suivants : *Erwinia*,
5 *Pseudomonas*, *Ralstonia* et *Xanthomonas*.

L'invention a notamment pour objet une souche *Xanthomonas* essentiellement dépourvue de caractère phytopathogène de manière stable et
10 ayant conservé sensiblement la capacité de production d'exopolysaccharide.

Par "essentiellement non phytopathogène", on entend l'absence de lésions et/ou flétrissures envahissantes sur des feuilles de plantes hôtes crucifères, notamment le chou (*Brassica oleracea*), après au moins 15 jours suivant l'inoculation de la feuille par blessure de la nervure centrale.

15 Avantageusement, la souche *Xanthomonas* est de l'espèce *campestris*, en particulier *pv campestris*.

L'inactivation du(des)dit(s) gène(s) est obtenue de préférence par une délétion d'au moins 1 kb, de préférence au moins 3 kb, avantageusement au moins 5 kb dans le groupe de gènes *hrp* ou *hrc*, de préférence 9 kb et
20 pouvant aller jusqu'à 40 kb dans le groupe de gènes *hrp* ou *hrc*.

Dans un mode de réalisation préféré, la souche de *Xanthomonas*, notamment *campestris* essentiellement non phytopathogène selon l'invention est obtenue par délétion des gènes *hrpA1* à *hrpC2* d'une souche sauvage phytopathogène de *Xanthomonas campestris pv campestris*.

25 La gomme xanthane produit par les souches de *Xanthomonas* de l'invention est une gomme xanthane sensiblement identique à celle produite par l'espèce sauvage, à savoir qu'elle présente sensiblement la même distribution de poids moléculaire, ainsi que le même degré de modifications, notamment des degrés d'acétylation et de pyruvylation.

30

L'invention a également pour objet un procédé de préparation d'une souche telle que définie ci-dessus, caractérisé en ce qu'elle est obtenue

par recombinaison homologue avec un plasmide comprenant une délétion de tout ou partie des gènes *hrp* ou *hrc*.

L'invention a en outre pour objet un procédé de préparation d'exopolysaccharide bactérien, notamment de gomme xanthane, caractérisé en ce que l'on cultive une souche bactérienne, le cas échéant, du genre *Xanthomonas*, de préférence de l'espèce *Xanthomonas campestris* telle que définie ci-dessus, dans des conditions permettant la production d'exopolysaccharide dans le milieu de fermentation.

Les exemples qui suivent illustrent la construction de souches de *Xanthomonas campestris* répondant aux caractéristiques de l'invention.

Dans ces exemples, la construction a été réalisée à partir d'une souche de *Xanthomonas campestris* pv *campestris* obtenue par criblage de gomme xanthane.

Il va de soi que d'autres souches de *Xanthomonas* et également de bactéries productrices d'exopolysaccharide appartenant à un genre différent accessibles à l'homme du métier peuvent être utilisées comme matière première de départ pour réaliser des souches non phytopathogènes, conformément aux connaissances générales du domaine technique en question et aux indications données ci-après, notamment en se référant aux parties de séquences rapportées dans le cas où la souche appartient à l'espèce *Xanthomonas campestris*.

Pour leur compréhension, on se reportera aux figures annexées sur lesquelles :

- la figure 1 schématise la stratégie de construction de dérivés de la souche de *X. campestris* RPA-BIOCAT826 porteurs d'une délétion de gènes *hrp*.

L'organisation des gènes *hrp* chez *X. campestris* pv *vesicatoria* est décrite par Fenselau et Bonas (1995, Mol. Plant Microbe Interact. 8 (6),

845-854) et par Fenselau *et al.*, (1992, Mol. Plant Microbe Interact. 5, 390-396) et est disponible en partie dans Genbank sous le numéro d'accès U 33548. Les régions homologues clonées à partir de la souche RPA-BIOCAT826 sont représentées ainsi que le nom des plasmides dans lesquels elles ont été clonées. La carte de restriction de la région *hrp* de *X. campestris* pv *campestris* est publiée par Arlat *et al.*, 1991, Mol. Plant Microbe Interact 4:593-601, et est complétée par les résultats présentés dans les exemples 1 à 4. La délétion $\Delta hrpA1-C2$ portée par le plasmide pRPA-BCAT140 décrit dans les exemples a été introduite dans le génome par double recombinaison homologue ;

- la figure 2 représente les signaux d'hybridation obtenus en Southern Blot avec la sonde HRPB5 décrite ci-dessous et les ADN génomique de la souche RPA-BIOCAT826 et de deux dérivés de cette souche ayant intégré la délétion $\Delta hrpA1-C2$. La position des bandes du marqueur de taille a été rapportée par comparaison avec la distance de migration sur le gel coloré au bromure d'éthidium avant transfert. Ces tailles sont exprimées en kilobases.

- la figure 3 représente les signaux d'hybridation obtenus en Southern Blot avec la sonde HRPC2 décrite ci-dessous et les ADN génomiques de la souche RPA-BIOCAT826 et de 5 dérivés de cette souche ayant intégré la délétion $\Delta hrpA1-C2$. La position des bandes du marqueur de taille a été rapportée par comparaison avec la distance de migration sur le gel coloré au bromure d'éthidium avant transfert. Ces tailles sont exprimées en kilobases.

Matériels et méthodes

Sauf autres précisions, les techniques mises en oeuvre sont des techniques classiques de biologie moléculaire et de microbiologie, connues de l'homme de l'art telles que décrites par exemple par Ausubel *et al.*, 1987 (Current Protocols in Molecular Biology, John Willey and Sons, New York ; Maniatis *et al.*, 1982, Molecular Cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York), Coligan *et al.*, 1997 (Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, Inc)..

1. Souche de départ

La souche RPA-BIOCAT826 est issue de la collection de Rhodia Chimie (Usine de Melle, RTAM) et a été sélectionnée pour son aspect morphologique blanc au lieu de l'habituel aspect jaune. Les souches RPA-BIOCAT1016, 1017, 1019 et 1021 ont été déposées à la CBS sous les numéros respectifs CBS 101940, CBS 10941, CBS 101942, CBS 101943 et CBS 101944.

2. Milieu de culture MSX

10

Le milieu MSX employé pour la culture des *Xanthomonas* contient : 0,2 g/l d'extrait de levure; 1,2 g/l de NH_4NO_3 ; 7,3 g/l de K_2HPO_4 ; 0,25 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1 g/l de glucose et 15 g/l de Bacto-Agar pour le milieu gélosé ; 10 g/l de glucose pour le milieu liquide. Le sulfate de magnésium et le glucose sont stérilisés à part et ajoutés extemporanément. Le pH du milieu est équilibré à pH 7,2 avant stérilisation avec de l'acide sulfurique dilué à 10 %.

15

Les préparations d'ADN génomique ont été réalisées à partir de jeunes cultures liquides en MSX (OD₆₆₀ inférieure à 0,4). Après centrifugation de 40 ml de culture, le culot cellulaire est repris dans 11,9 ml de tampon TE (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, New York) et 630 µl de SDS 10 % (Sodium Dodecyl Sulfate) puis 63 µl de Protéinase K à 20 mg/ml sont ajoutés. Après incubation de 1 h à 37°C, 2,1 ml de NaCl 5M sont ajoutés, suivis par 1,7 ml de 10% CTAB dans une solution de NaCl 0,7M et le tout est incubé 10 min à 65°C. Après une première extraction avec un volume équivalent d'un mélange chloroforme/alcool isoamylique (24 :1) suivie d'une deuxième extraction par un volume équivalent d'un mélange phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25 :24 :1), le surnageant est ajouté à 0,6 volume d'isopropanol. Après centrifugation (5 min à 10 000 tours/min), le culot obtenu est lavé dans de l'éthanol à 70% puis séché avant d'être repris dans au moins 2 ml de TE auxquels est ajouté 25 µl d'une solution de RNase à 5 mg/ml. Après une incubation de 1 h à 37°C, une extraction au phénol/chloroforme/alcool isoamylique est réalisée et l'ADN du surnageant est

20

25

30

précipité par ajout de 0,1 volume d'Acetate de sodium 3 M et de 2,5 volume d'éthanol. Le culot obtenu après centrifugation de 5 minutes à 14 000 tours/min est lavé à l'éthanol 70%, séché, puis resuspendu dans au moins 0,5 ml de TE.

5

EXEMPLE 1 :

Clonage de la région *hrpC2* de RPA-BIOCAT826

10

La région visée a été amplifiée par PCR à partir de l'ADN génomique de la souche RPA-BIOCAT826 en utilisant les amorces XcC2.3 (SEQ ID N°1) et XcC2.4 (SEQ ID N°2). L'ADN génomique de la souche RPA-BIOCAT826 a été extrait et utilisé dans une réaction de PCR contenant 100 ng d'ADN génomique, 40 pmole de chaque amorce, 0,2 mM dNTP, 1,25 U de polymérase Pwo (Boehringer Mannheim) dans un volume final de 50 µl du tampon de cette enzyme. Après une incubation de 5 min à 95°C, le mélange a d'abord subi 30 cycles comprenant une incubation de 1 min à 94°C, puis 1 min à une température allant de 63°C à 48°C (par pas de 0,5°C par cycle) et 1 min à 72°C, puis 15 cycles comprenant une incubation de 1 min à 94°C, suivie de 1 min à 48°C et d'une minute à 72°C, et enfin 10 min à 72°C. Le produit d'amplification de taille voisine de 1,2 kb a été purifié par migration sur gel d'agarose puis à l'aide du kit Qiaex (Quiagen). Il a ensuite été cloné dans le vecteur pZERO-1 (Invitrogen BV) ouvert par EcoRV. Après transformation de la souche *E. coli* JM110, un clone hébergeant un plasmide ayant intégré le fragment de 1,2 kb a été retenu. Ce plasmide a été appelé pRPA-BCAT91 et l'insert qu'il contenait a été séquencé (Genome Express, Grenoble, France). La séquence obtenue (SEQ ID N°3) a été alignée avec la séquence du gène *hrpC2* de *X. campestris pv vesicatoria* (Fenselau et al., 1992, Molecular Plant-Microbe Interactions, 5 : 390-396). Une identité de 87% a été trouvée sur les 1188 bp représentant 61% du gène *hrpC2*. La séquence en acides aminés déduite de la séquence nucléotidique montre un pourcentage d'identité de 92% par rapport à la portion équivalente de la séquence de la protéine *HrpC2* de *X. campestris pv vesicatoria*.

15

20

25

30

EXEMPLE 2 :**Clonage de la région HrpA de RPA-BIOCAT826**

5 Cette région a été clonée en criblant une banque partielle génomique de la souche RPA-BIOCAT826 à l'aide d'une sonde nucléotidique correspondant à la région équivalente de la souche *X. campestris pv vesicatoria*. Cette région est disponible dans un plasmide dénommé pL3o qui
10 contient un insert de 6,6 kb EcoRV englobant les gènes *hrpB8* et *hrpA1* de *X. campestris pv vesicatoria* (Fenselau et al., 1992, Molecular Plant-Microbe Interactions, 5 : 390-396).

La sonde HRP A1 a été préparée par PCR en utilisant les amorces XcvA15 (SEQ ID N°4) et XcvA18 (SEQ ID N°5) à raison de 40 pmole
15 chacune, la matrice plasmidique pL3o (40 ng), 0,2 mM dNTP, 1,25 U de polymérase Pwo (Boehringer Mannheim) dans un volume final de 50 µl du tampon de cette enzyme. Après une incubation de 5 min à 95°C, le mélange a subi 30 cycles comprenant une séquence de 30 secondes à 94°C, 1 min à 55°C et 1,5 min à 72°C. Après une dernière incubation de 10 min à 72°C, le
20 produit d'amplification de 664 bp a été purifié sur gel d'agarose puis par le kit Quiaex (Quiagen).

Environ 10µg d'ADN génomique de la souche RPA-BIOCAT826 ont été digérés par 100 unités d'EcoRI pendant 16h à 37°C. La technique classique de Southern Blot a ensuite été employée afin de déterminer la taille
25 du fragment EcoRI hybridant avec la sonde HRP A1 décrite ci-dessus. Après migration sur gel d'agarose de la digestion EcoRI ci-dessus, transfert sur une membrane Hybond N+ (Amersham) par hybridation à 55°C pendant 19h dans une solution aqueuse d'hybridation (0,5 % SDS ; 6% SSC ; 0,25% de lait écrémé en poudre) avec la sonde HRP A1 marquée au phosphore 32 grâce au
30 kit Ready-To-Go (Pharmacia Biotech) selon les indications du fabricant et lavage à 55°C par une solution de 0,2 SSC et 0,1% SDS, la membrane a été mise en autoradiographie pendant 19 h à -80°C. Le développement du film a révélé un signal d'hybridation de taille voisine de 7,3 kb.

Une banque partielle génomique de la souche RPA-BIOCAT826 a donc été réalisée en digérant 100 µg d'ADN génomique de cette souche par 1000 unités de l'enzyme EcoRI pendant 20 h à 37°C. Après migration sur gel d'agarose, la zone correspondante aux fragments de taille comprise entre 7 et 8 kb a été découpée et l'ADN extrait du gel par électroélution dans un boudin de dialyse (membranes Spectra/Por de Spectrum Medical Industries, Inc). Après précipitation à l'éthanol, l'ADN a été ligaturé dans un volume final de 10 µl au vecteur pBlueScript II SK (Stratagene) préalablement ouvert par l'enzyme EcoRI puis dephosphorylé avec la phosphatase alcaline de crevette (United States Biochemicals). Après incubation du mélange de ligation 14h à 16°C, un dixième du mélange a été utilisé pour transformer par électroporation des cellules d'*E. coli* DH5alpha. Environ 3000 transformants ont été analysés par hybridation de colonies transférées sur membrane de nylon en utilisant la sonde HRP A1. Douze colonies donnant un signal d'hybridation positif ont été purifiées sur milieu gélosé LB contenant 100 µg/ml d'ampicilline. Les plasmides de douze colonies purifiées ont été extraits et des digestions EcoRI des ces plasmides ont été analysées par Southern blot avec la sonde HRP A1 pour confirmer la présence d'un fragment d'environ 7,3 kb hybridant avec cette sonde. Après une analyse de restriction avec diverses enzymes, un fragment de 2,7 kb SacII et un fragment de 1,6 kb SacII ont été sous-clonés dans le vecteur pBlueScript II SK ouvert par SacII pour donner respectivement les vecteurs pRPA-BCAT135 et pRPA-BCAT134. Le séquençage partiel de ces deux vecteurs a été réalisé (Genome Express, Grenoble) et a révélé la présence d'une phase ouverte de lecture de 1818 bp (SEQ ID N°6) dont la séquence peptidique déduite présente 85% d'identité avec la protéine HrpA1 de *X. campestris pv vesicatoria* (Fenselau et al., 1992, Molecular Plant-Microbe Interactions, 5 : 390-396).

30

EXEMPLE 3 :

Construction de souches dérivées de RPA-BIOCAT826 contenant une délétion $\Delta hrpA1-C2$

La délétion $\Delta hrpA1-C2$ a été construite *in vitro* en clonant dans le plasmide pJQ200SK (Quandt et Hynes, 1993, Gene 127 : 15-21) un fragment de pRPA-BCAT134 et un fragment de pRPA-BCAT91 (cf figure 1). Le plasmide pRPA-BCAT91 a été ouvert par NcoI puis traité à la polymérase I (fragment de Klenow) pendant 15 min à 30°C en présence de 25µM de dNTP. Après extraction au phénol/chloroforme/alcool isoamylique puis précipitation à l'éthanol, l'échantillon a été repris dans 40 µl d'eau pour être traité par 20 unités de XbaI à 37°C puis et 20 unités d'ApoI à 50°C. Le fragment d'environ 1,2 kb a alors été séparé sur gel et récupéré avec le kit Quiex II (Quiagen). Le fragment d'environ 1,3 kb RsaI-SacII de pBCAT134 a été purifié de façon identique. Ces deux fragments ont été ligaturés au vecteur pBlueScript II SK ouvert par les enzymes SacII et XbaI pour donner le plasmide pRPA-BCAT139. Un fragment SacI-XbaI d'environ 2,5 kb porteur de la délétion $\Delta hrpA1-C2$ a alors pu être extrait de ce plasmide pour être cloné dans le plasmide pJQ200KS ouvert par les enzymes SacI et XbaI. Le plasmide résultant a été nommé pRPA-BCAT140. C'est un plasmide non réplcatif chez *X. campestris*, porteur du marqueur de résistance à la gentamycine permettant de sélectionner les clones de *X. campestris* ayant intégré le plasmide par recombinaison homologue et porteur du marqueur de sélection positive sacB qui permet de sélectionner les clones ayant éliminé le marqueur de résistance à la gentamycine suite à un deuxième événement de recombinaison homologue.

Le plasmide pRPA-BCAT140 a été introduit dans la souche RPA-BIOCAT826 par conjugaison. Pour ce faire, ont été mélangés sur milieu gélosé MSX 40 µl d'une culture en phase exponentielle de la souche DH5alpha hébergeant pRPA-BCAT140, 40 µl d'une culture en phase exponentielle de la souche HB101 hébergeant le plasmide pRK2013 (Ditta et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 : 7347-7351) et 40 µl d'une culture de la souche RPA-BIOCAT826 en phase exponentielle dans un milieu MSX. Après incubation pendant 24h à 30°C, les clones de *X. campestris* ayant intégré le plasmide pRPA-BCAT140 ont été purifiés deux fois de suite sur un milieu gélosé MSX contenant 15 µg/ml de gentamycine. Huit clones ont ensuite été étalés sur une surface d'environ 1 cm² sur un milieu gélosé MSX

contenant 5% de sucrose. Après une incubation de 72h à 30°C, des colonies ont été isolées par deux purifications successives sur milieu gélosé MSX. Environ 300 colonies ont ensuite été repiquées sur milieu gélosé MSX contenant 15 µg/ml de gentamycine afin d'identifier les clones sensibles à la gentamycine (de 90 à 100 % des clones en fonction des essais). Une quarantaine de ces clones ont ensuite été analysés par Southern Blot en utilisant une digestion EcoRI-BamHI de leur ADN génomique et la sonde HRPA1. Environ 25 % des clones présentaient un signal différent de celui de la souche sauvage RPA-BIOCAT826 et cohérent avec l'intégration de la délétion *ΔhrpA1-C2*. Cinq clones ont été retenus pour la suite des expériences : souches RPA-BIOCAT 1016, 1017, 1019, 1021, 1022.

EXEMPLE 4 :

Caractérisation par Southern Blot des souches dérivées de RPA-BIOCAT826 contenant une délétion *ΔhrpA1-C2*

Les souches RPA-BIOCAT 1016, 1017, 1019, 1021 et 1022 ont été caractérisées en analysant les profils d'hybridation de digestions d'ADN génomique EcoRI, BamHI et EcoRI-BamHI avec les sondes HRP3'A1, HRPB5 et HRPC2.

La sonde HRP3'A1 a été obtenue en purifiant le fragment de 1,6 kb SacII du plasmide pRPA-BCAT134 par migration sur gel et utilisation du kit Quiaex.

La sonde HRPC2 a été obtenue en purifiant le fragment de 1,2 kb EcoRI-XbaI du plasmide pRPA-BCAT91 par migration sur gel et utilisation du kit Quiaex.

La sonde HRPB5 a été obtenue en purifiant le fragment de 1,5 kb BamHI du plasmide pRPA-BCAT129 par migration sur gel et utilisation du kit Quiaex. Le séquençage de cet insert a révélé notamment une phase ouverte de lecture (SEQ ID n°7) dont la séquence peptidique déduite présente 77% d'identité avec la protéine HrpB5 de *X. campestris pv vesicatoria* (Fenselau et al., 1995, Mol. Plant-Microbe Interactions, 8 : 845-854). Le plasmide pRPA-

BCAT129 a été obtenu en clonant les fragments BamHI d'ADN génomique de la souche RPA-BIOCAT826 de taille comprise entre 1,3 et 1,9 kb dans le vecteur pBlueScriptII SK et en criblant les colonies avec une sonde HRPB de manière analogue à celle décrite dans l'exemple 2. La sonde HRPB a été
 5 obtenue par PCR en utilisant les amorces RST2 et RST3 (Leite *et al.*, 1994, Appl. Environ. Microbiol. 60 : 1068-1077) et la matrice plasmidique pB10g (U. Bonas, communication personnelle). Le plasmide pB10g correspond au plasmide pBluescriptKS dans lequel est cloné le fragment de 7,3 kb BamHI contenant la région *hrpB* et le gène *hrpA1* de *Xanthomonas campestris* pv
 10 *vesicatoria* (Fenselau *et al.*, 1995, Mol. Plant-Microbe Interactions, 8 : 845-854). La réaction de PCR a été réalisée avec 40 pmole de chaque amorce, 50 ng de pB10g, 0,2 mM dNTP, 1,25 U de polymérase Pwo (Boehringer Mannheim) dans un volume final de 50 µl du tampon de cette enzyme. Après une incubation de 5 min à 95°C, le mélange a d'abord subi 24 cycles
 15 comprenant une incubation de 30 secondes à 95°C, puis 40 secondes à une température allant de 70°C à 63°C (par pas de 0,3°C par cycle) et 1 min à 72°C, puis 6 cycles comprenant une incubation de 30 secondes à 95°C, suivie de 40 secondes à 63°C et d'une minute à 72°C, et enfin 5 min à 72°C. Le fragment d'environ 840 bp a ensuite été purifié sur gel d'agarose et à l'aide du
 20 kit Quiaex (Quiagen).

L'analyse en Southern Blot a été réalisée en marquant les sondes à l'aide du kit « Megaprime DNA labelling system » (Amersham) selon les instructions fournies. Après migration sur gel d'agarose, les digestions d'ADN génomiques ont été transférées sur membranes Hybond N+
 25 (Amersham) selon les indications fournies, puis incubées dans la solution d'hybridation composée d'un tampon phosphate 0,5M et de SDS 7% (115 ml de Na₂HPO₄ 1M, 84,6 ml de NaH₂PO₄ M, 200 ml H₂O, 28 g SDS). Les sondes marquées sont incubées 5 min à 100 °C, puis 5 min à température ambiante avant d'être diluées dans 12 ml de solution d'hybridation et incubées
 30 5 min à 100°C. Ce mélange est alors mis au contact des membranes pendant 6 à 20 h à 65°C. Celles-ci sont ensuite lavées 10 à 15 minutes dans un tampon phosphate 0,1 M contenant 1% de SDS (42,3 ml Na₂HPO₄ 1M, 57,7 ml NaH₂PO₄ 1M, 900 ml H₂O, 10 g SDS) puis mis en exposition.

Les résultats obtenus avec la sonde HRPB5 (figure 2) montrent, pour la souche RPA-BIOCAT826, un signal d'hybridation à environ 4,8 kb avec la digestion EcoRI et un signal à 1,6 kb avec la digestion BamHI et la digestion EcoRI-BamHI. Ces résultats sont en accord avec la cartographie de Arlat *et al.* (Molecular Plant-Microbe Interactions, 1991, 4 : 593-601) et la localisation du gène *hrpB5* décrit ci-dessus. Aucune des souches RPA-BIOCAT étudiées ne montre de signal d'hybridation avec HRPB5, ce qui est cohérent avec l'intégration de la délétion $\Delta hrpA1-C2$ dans le génome de ces souches RPA-BIOCAT 1016, 1017, 1019, 1021 et 1022 (La figure 2 ne montre que le résultat d'hybridation obtenu avec les souches RPA-BIOCAT).

Les résultats obtenus avec la sonde HRPC2 (figure 3) montrent, pour la souche RPA-BIOCAT826, un signal d'hybridation à environ 5,5 kb avec les digestions EcoRI et un signal à environ 2,6 kb avec la digestion EcoRI-BamHI. Ces résultats sont en accord avec la cartographie de Arlat *et al.* (Molecular Plant-Microbe Interactions, 1991, 4 : 593-601), l'organisation des gènes *hrp* chez *X. campestris pv vesicatoria* (Fenselau *et al.*, 1992, Molecular Plant-Microbe Interactions, 5 : 390-396) et la localisation du gène *hrpB5* décrit ci-dessus. Les résultats obtenus avec les souches RPA-BIOCAT 1016, 1017, 1019, 1021 montrent un signal entre 7 et 8 kb avec les digestions BamHI et un signal à 4,4 kb avec les digestions EcoRI-BamHI. Compte tenu de la cartographie présentée dans la figure 1, ces résultats sont cohérents avec l'intégration de la délétion $\Delta hrpA1-C2$ dans le génome des souches RPA-BIOCAT 1016, 1017, 1019, 1021 et 1022.

Enfin, les résultats obtenus avec la sonde HRP3'A1 montrent, pour la souche RPA-BIOCAT826, un signal d'hybridation à 7,3 kb environ pour la digestion EcoRI-BamHI. Avec les souches RPA-BIOCAT 1016, 1017, 1019, 1021, ce signal d'hybridation est à 4,4 kb, ce qui est cohérent avec l'intégration de la délétion $\Delta hrpA1-C2$ dans le génome des ces souches.

EXEMPLE 5 :**Virulence des souches dérivées de RPA-BIOCAT826
contenant une délétion HrpA1-C2**

5

Les tests de virulence ont été effectués sur des plants de choux (*Brassica oleracea* var. *capitata* cultivar *Siria*) dont les semences ont été obtenues auprès de Clause Semences (av. Lucien Clause, 91221 Brétigny-sur-Orge, France). Les plantes ont été cultivées en cellule climatique selon les paramètres suivants : 14 heures à 25°C, 55% d'humidité, intensité lumineuse saturante (4000 W/m); 10 heures à 25°C, 60% d'humidité. Elles ont été infectées au stade 2 feuilles soit environ 13 jours après semis. Pour chaque souche testée, 8 plants ont été utilisés en perçant la première feuille dans la nervure centrale de la partie terminale à l'aide d'un cure-dent infecté. La contamination du cure-dent a été réalisée en immergeant sa pointe dans une culture de la souche étudiée de 2 jours en milieu MSX (environ 10⁸ bactéries/ml). Les contrôles négatifs étaient constitués par un mélange de souches de *X. campestris* pv *vesicatoria* (souche B229RI = RPA-BIOCAT381 et souche B230RII = RPA-BIOCAT382), phytopathogènes de référence sur piments isolées chez Clause Semences. Les contrôles positifs étaient constitués par un mélange de souches de *X. campestris* pv *campestris* (souche 2963 = RPA-BIOCAT379 et souche 63C2AM = RPA-BIOCAT380), phytopathogènes de référence sur choux isolées chez Clause Semences. Les symptômes (lésions jaunes en forme de V) ont été lus et mesurés 12 et 14 jours après infection. Pour chaque plante, une note a été donnée selon la correspondance suivante : 0, aucun symptôme ; 1, dépigmentation localisée à proximité du point d'infection ; 2, nécrose inférieure à 0,5 cm² ; 3, nécrose de 0,5 à 1,5 cm² ; 4, nécrose supérieure à 1,5 cm² ; 5, nécrose généralisée de la feuille. La somme des notes des 8 plantes infectées avec la même souche est la note de pathogénicité de cette souche (Tableau 1).

30

Tableau 1 : Phytopatogénicité des souches de *Xanthomonas*

| SOUCHES | J + 12 | J + 14 |
|----------------|--------|--------|
| BIOCAT 381/382 | 0 | 0 |
| BIOCAT 379/380 | 32 | 39 |
| BIOCAT826 | 28 | 34 |
| BIOCAT 1016 | 4 | 4 |
| BIOCAT 1017 | 5 | 5 |
| BIOCAT 1019 | 2 | 3 |
| BIOCAT 1021 | 1 | 1 |
| BIOCAT 1022 | 4 | 5 |

Alors que la souche RPA-BIOCAT826 provoque le flétrissement progressif de la feuille, les souches construites provoquent au maximum un flétrissement nécrotique localisé, ce qui traduit une absence de pathogénicité.

EXEMPLE 6 :

Production de xanthane par les souches dérivées de RPA-BIOCAT826 contenant une délétion HrpA1-C2

La productivité de xanthane des souches a été évaluée en mesurant la matière sèche précipitable à l'isopropanol contenu dans 40 ml de culture. Après 24 heures de préculture en MSX, 100 ml de milieu MSX en fioles erlenmeyers de 500 ml ont été inoculés avec approximativement le même nombre de bactéries (0,4 ml de préculture de OD660 = 0,25). Après 6 jours d'incubation à 30°C sous agitation (200 tours/min), 40 grammes de cultures ont été prélevés et mélangés à 150 ml d'isopropanol. Après filtration, les fibres récupérées ont été lavées deux fois par 70 ml d'isopropanol avant d'être séchées puis pesées en sortie d'étuve. L'opération réalisée sur trois cultures indépendantes de la souche RPA-BIOCAT826 a montré une variabilité de la productivité de l'ordre de 10 %. Les résultats obtenus avec la souche

RPA-BIOCAT826 et ses dérivées $\Delta hrpA1-C2$ sont regroupés dans le tableau 2.

Tableau 2 : Productivité de xanthane de RPA-BIOCAT826 et de ses dérivés $\Delta hrpA1-C2$.

| SOUCHE | POIDS SEC Xt (g) | PRODUCTIVITE (g/g) |
|-------------|------------------|----------------------|
| BIOCAT826 | 0,323 | $8,1 \times 10^{-3}$ |
| BIOCAT 1016 | 0,362 | $9,0 \times 10^{-3}$ |
| BIOCAT 1017 | 0,366 | $9,1 \times 10^{-3}$ |
| BIOCAT 1019 | 0,371 | $9,3 \times 10^{-3}$ |
| BIOCAT 1021 | 0,334 | $8,4 \times 10^{-3}$ |
| BIOCAT 1022 | 0,329 | $8,2 \times 10^{-3}$ |

Les productivités sont exprimées en grammes de matière sèche extractible à l'isopropanol par grammes de culture.

REVENDECATIONS

5 1. Souche bactérienne ayant perdu le caractère phytopathogène par inactivation d'au moins un gène de virulence et ayant conservé la capacité de production d'exopolysaccharide.

10 2. Souche bactérienne selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle a été rendue stablement non phytopathogène par inactivation d'au moins un gène, avantageusement au moins deux gènes, de préférence au moins trois gènes du groupe de gènes *hrp* ou *hrc*.

15 3. Souche bactérienne selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisée en ce qu'elle a été rendue stablement non phytopathogène par inactivation de 5 à 9 gènes du groupe de gènes *hrp* ou *hrc*.

20 4. Souche *Xanthomonas* ayant perdu le caractère phytopathogène par inactivation d'au moins un gène de virulence et ayant conservé la capacité de production d'exopolysaccharide.

5. Souche *Xanthomonas* selon la revendication 4, caractérisée en ce qu'elle est de l'espèce *Xanthomonas campestris*.

25 6. Souche *Xanthomonas* selon la revendication 5, caractérisée en ce qu'il s'agit de *Xanthomonas campestris pv campestris*.

30 7. Souche *Xanthomonas* selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que l'inactivation du ou desdit(s) gène(s) est obtenue par délétion d'une région d'ADN d'au moins 1 kb, de préférence au moins 3 kb, avantageusement au moins 5 kb dans le groupe de gènes *hrp* ou *hrc*, et en ce qu'elle conserve la capacité de produire de l'exopolysaccharid .

8. Souche *Xanthomonas* selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle comprend une délétion d'une région d'ADN d'au plus 40 kb.

5 9. Souche *Xanthomonas* selon la revendication 8, caractérisée en ce qu'elle est obtenue par délétion de tout ou partie des gènes *hrp A1* à *hrpC2*.

10 10. Souche *Xanthomonas* essentiellement non phytopathogène, caractérisée en ce qu'elle comprend une délétion d'une région d'ADN d'au moins 1 kb, de préférence au moins 3 kb, avantageusement au moins 5 kb dans le groupe de gènes *hrp* ou *hrc*, et en ce qu'elle conserve la capacité de produire de l'exopolysaccharide.

15 11. Souche *Xanthomonas* essentiellement non phytopathogène, caractérisée en ce qu'elle est obtenue par délétion de tout ou partie des gènes *hrp A1-C2*.

20 12. Souches *Xanthomonas campestris* essentiellement non phytopathogènes choisies parmi les souches BIOCAT 1016, BIOCAT 1017, BIOCAT 1019, BIOCAT 1021 et BIOCAT 1022, déposées à la CBS respectivement sous les numéros CBS 101940, CBS 10941, CBS 101942, CBS 101943 et CBS 101944.

25 13. Souche *Xanthomonas* selon l'une des revendications 4 à 13, caractérisée en ce que l'exopolysaccharide est une gomme xanthane.

14. Plasmide pRPA-BCAT 140 utilisé pour la fabrication de la souche selon les revendications 9 à 13.

30 15. Procédé de préparation d'une souche selon l'une quelconque des revendications 7 à 13, caractérisé en ce qu'elle est obtenue par recombinaison homologue avec un plasmide comprenant une délétion de tout ou partie des gènes *hrp* ou *hrc*.

5 16. Procédé de préparation d'exopolysaccharide bactérien, notamment de gomme xanthane, caractérisé en ce que l'on cultive une souche bactérienne, le cas échéant, du genre *Xanthomonas*, de préférence l'espèce *Xanthomonas campestris* selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, dans des conditions permettant la production d'exopolysaccharide dans le milieu de fermentation.

10 17. Séquence nucléotidique SEQ ID n° 3.

18. Séquence nucléotidique SEQ ID n° 6.

19. Séquence nucléotidique SEQ ID n°7.

SEQ ID N°1 :

XcC2.3

AAATTCGTCAAGGGTGATGC

SEQ ID N°2 :

XcC2.4

GTTCCACCTGGTCGACAAGC

SEQ ID N°3 :

HrpC2 de pBCAT91 (1188 bp)

aaattcgtcaagggtgatgcgatcgccggcctggtgatcaccatggtcaacatcttggccggcatcgtggtaggcgtgacctaccacgg
catgagcgcgggcgaggccccaaccgcttgcgatcctgtcggtaggcgatgcgatggtgtcgcagatgcctcgtgctgatctcg
gtggcgccggcgctcatgatcaccgcgtcgccaacgagaatgaaaccaagatcagctcgctcgggctcgacatcgccgccagct
caccagcaacgcacgtgccttgatggcagcgagtgtgctgctggcctgcttgcgttcgtgccgggatttccggcgctgctgttctgct
gctggcagcggcggtcgggtgccgggggctatacgatctggcgcaagcaacgcgacaccagcgggagcgatcagcccgcactgcc
atcaaccagccgcaaagggtgcaaaggcgatgcgccgcacatccgcaagagcgccccggatttcgctcgccttgcgatcgggct
ttcgccgcaactgggtgcacggctcgaccggcgctgctggatcaggcgatcgaaagcgagcggaggcaattggtcgagctgctgg
gattgccgttcccggggatcgcgatatggcagagcgaatccctgcagggcctgcagtacgaagtgttgatccacgatgtgccggaac
ccgcagcgcgttgagcgatacggcggacatgcagaaagcgtggcccaacaagccatcgacaccgttgcatgcacgcgcgatctgtt
cgtcggcatccaggagacgcagtggatgctggaacagggtgggcgcggactatcccgggctggttcagaggtaacaaggccatgc
cagcccaacgcatcgccgatgtgttcggcgactgctggaagaacgcacatcccgggtgcgcaacatcaagagcatcctggagagcctg
gtggtgtggggaccgaaggaaaaggatctgctgatgctgaccgagtatgtgcgctgcgatctcgccgctatcttgcgcacaccgcga
ccgcaggcaccggacagctgcctgcgggtgatgctcgaccacgccgtggaacagttgatccggcagtcgattcgcgccacaccggcc
ggcaatttctggcgctgccaccggagcaggccaatcagcttgcgaccaggtggaaa

SEQ ID N°4 :

XcvA15

GATCCAACAGCTGGACAACC

SEQ ID N°5 :

XcvA18

AACGGAATCTTCGACAGGCC

SEQ ID N°6 :

hrpA1

atggcatacgcctgtcctccagttcaccgccatcgacgcgcgccgttggccgctgccttgttgcttggcttgctgccgctgctgccgccg
catgccaacgccgcgtcggcgccgtggcactcgcgcagcttcaaatacgttgccgaccgcaaggatctcaaggagggtgctgcgcgac
ctgtccgccagccaatccatcaccacctggatttcaccggaggtgaccggcacgctcagtggaattcgaagccactccgcagaagt
ttctcgacgatctatcgggcacgttcggtttgtctggtattacgatggctcgggtgctcagaatctggggcggaacgagaccaagaatg
cgaccttgagtttgggcgctgcatcgacgagtgcgctgcgcgatgcgcttgcgcgatcgggctggacgatccgcgctttccggtccg
ttatgacgagacagcgcacctggcggtgggtcggggcccggggttatgtggataccgtcggcgcatcgccaagcaggtcgagc
aggtcgcgcgccaacgcgacgccaccgaagtgcaggtgttcagctgcattatgcgcaggcgccgaccacaccaccgcacggt
ggtcaagacatccaggtgccgggcatggccagcctgttgcgaacatatacggcgctgcgtggcgcgccactcggcgctgcccgg
gccaggcgcggaatttcgggcgtgtgcaaccgatcggcgggtggctcgtcaataccttcggcaacagcggtcagcgccagagtggcg
gcagcggcattctcggtttgcctgcgtcgtggttcggcgctgggtcgccgtccgagcgggtgccggtcagtcgccggtgccgggca
gtggcaatagcgccaatgcgccggccagcgtgtggccggagatgagccaggccagacgcgatcgccgctggcggtggacgccg
gcagcggcggtgagctggcatccgacgcgccggtgatcgaagccgaccgcgcaccaacggcattctcattcgacccgccccga
gcggatggccgcctatggcacgttgatccagcagctcgacaaccgtcccaagctgctgcagatcgatgccaccatcatcgatccgc
gacggcgccctgcaggatctcggcggtgactggcggttcacagccggcggtgtggatgtgcagaccggcgacggcggtgtgtggcc
agcttggctacgatggcagcttgagcgggtgcagcagccgccggtgcagccgcgccgttggcggggacgttgaccgctgtcctgggc
gatgcagggcggttacctgatgacgcgcgtctcggcgctcgagcagaccaacaaggccaagatcgtctccaccccgaggtggcgac
gctggacaacgtggaagcggtgatggaccacaagcaacaggcattcgtgcgtgtcagcggttatgcatccgccgacctctacaacctg
tccgcgggtgtatcgctacgcgtattgccaagtgtgtgccggggtcgccaaatggtcagatgcgcctggatgtgcgtatcgaagacg
ggcagttgggcgccaataccgtcgatggcattcccgatcacctccagcgagatcaccacgcaggccttcgtcaacgagggccaga
gcctgctgatcgccggttatgcttccgacaccgatcagacagatctgaacaacgtccccgggctgtccaggattccattggtcggcaac
ctgttcaagcatcgccagcagagcgggtcgcggttgacgcggtgttctgctgaccccgcatatcgtctgcacctga

séquence n°7 :

hrp B5

atgctctttggctgaggtccacaccggaagcggctggccttgactgcgaggtcatccacgcgaggcattggcctgtgtgctggaact
ggacgcagcgggtgcacaggtgcacgcgcgttgcgcgcaggcgtggcggacgcccagacgcgtgcgcaggcgtgctcgacg
ctgcccacggcaggccgaggccatccttcaggatggccacgacagggccgagcgcagtgcacgcctgggctatgccgccgggct
gcgccgtcagctcgacgcgtggaacgagcgcggcgtgcggcatgccttcgcgcccaggacgccgcacggcgccccgcgagc
gcctggccgagatcgtcgcgcacgcctgcgagcaggttctgcacgggcacgatcctgcggcgctgtacgcgcgcgccgcacaggc
gctggacggcgccctggacgagggcgaacgccctgcaggtgagcgtgcatcccgatgcgctggacgatgcacggcgcgcccttcgat
gogggcgacggccggcgatggagcatgccggtggaactgtgcggtgatacgactctggccttgggtgcctgcgtgtgcgaatg
ggataccggcgtgttcgagaccgatctgcgtgatcagctgcgcagtctccggcgcgctattcgccgcgtgttggccacgccgcaggc
ggtgccggatgcttgctga

1. Souche de départ

La souche RPA-BIOCAT826 est issue de la collection de Rhodia Chimie (Usine de Melle, RTAM) et a été sélectionnée pour son aspect morphologique blanc au lieu de l'habituel aspect jaune. Les souches RPA-BIOCAT1016, 1017, 1019 et 1021 ont été déposées à la CBS sous les numéros respectifs CBS 101940, CBS 101941, CBS 101942, CBS 101943 et CBS 101944.

2. Milieu de culture MSX

Le milieu MSX employé pour la culture des *Xanthomonas* contient : 0,2 g/l d'extrait de levure; 1,2 g/l de NH_4NO_3 ; 7,3 g/l de K_2HPO_4 ; 0,25 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1 g/l de glucose et 15 g/l de Bacto-Agar pour le milieu gélosé ; 10 g/l de glucose pour le milieu liquide. Le sulfate de magnésium et le glucose sont stérilisés à part et ajoutés extemporanément. Le pH du milieu est équilibré à pH 7,2 avant stérilisation avec de l'acide sulfurique dilué à 10 %.

Les préparations d'ADN génomique ont été réalisées à partir de jeunes cultures liquides en MSX (OD₆₆₀ inférieure à 0,4). Après centrifugation de 40 ml de culture, le culot cellulaire est repris dans 11,9 ml de tampon TE (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, New York) et 630 µl de SDS 10 % (Sodium Dodecyl Sulfate) puis 63 µl de Protéinase K à 20 mg/ml sont ajoutés. Après incubation de 1 h à 37°C, 2,1 ml de NaCl 5M sont ajoutés, suivis par 1,7 ml de 10% CTAB dans une solution de NaCl 0,7M et le tout est incubé 10 min à 65°C. Après une première extraction avec un volume équivalent d'un mélange chloroforme/alcool isoamylique (24 :1) suivie d'une deuxième extraction par un volume équivalent d'un mélange phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25 :24 :1), le surnageant est ajouté à 0,6 volume d'isopropanol. Après centrifugation (5 min à 10 000 tours/min), le culot obtenu est lavé dans de l'éthanol à 70% puis séché avant d'être repris dans au moins 2 ml de TE auxquels est ajouté 25 µl d'une solution de RNase à 5 mg/ml. Après une incubation de 1 h à 37°C, une extraction au phénol/chloroforme/alcool isoamylique est réalisée et l'ADN du surnageant est

REVENDEICATIONS

1. Souche bactérienne ayant perdu le caractère phytopathogène par inactivation d'au moins un gène de virulence et ayant conservé la capacité de production d'exopolysaccharide.

2. Souche bactérienne selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle a été rendue stablement non phytopathogène par inactivation d'au moins un gène, avantageusement au moins deux gènes, de préférence au moins trois gènes du groupe de gènes *hrp* ou *hrc*.

3. Souche bactérienne selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisée en ce qu'elle a été rendue stablement non phytopathogène par inactivation de 5 à 9 gènes du groupe de gènes *hrp* ou *hrc*.

4. Souche bactérienne selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une souche *Xanthomonas* ayant perdu le caractère phytopathogène par inactivation d'au moins un gène de virulence et ayant conservé la capacité de production d'exopolysaccharide.

5. Souche *Xanthomonas* selon la revendication 4, caractérisée en ce qu'elle est de l'espèce *Xanthomonas campestris*.

6. Souche *Xanthomonas* selon la revendication 5, caractérisée en ce qu'il s'agit de *Xanthomonas campestris* *pv* *campestris*.

7. Souche *Xanthomonas* selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que l'inactivation du ou desdit(s) gène(s) est obtenue par délétion d'une région d'ADN d'au moins 1 kb, de préférence au moins 3 kb, avantageusement au moins 5 kb dans le groupe de gènes *hrp* ou *hrc*, et en ce qu'elle conserve la capacité de produire de l'exopolysaccharide.

~~révisé~~ rectifié

8. Souche *Xanthomonas* selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle comprend une délétion d'une région d'ADN d'au plus 40 kb.

5

9. Souche *Xanthomonas* selon la revendication 8, caractérisée en ce qu'elle est obtenue par délétion de tout ou partie des gènes *hrp A1* à *hrpC2*.

10

10. Souche *Xanthomonas* essentiellement non phytopathogène, caractérisée en ce qu'elle comprend une délétion d'une région d'ADN d'au moins 1 kb, de préférence au moins 3 kb, avantageusement au moins 5 kb dans le groupe de gènes *hrp* ou *hrc*, et en ce qu'elle conserve la capacité de produire de l'exopolysaccharide.

15

11. Souche *Xanthomonas* essentiellement non phytopathogène, caractérisée en ce qu'elle est obtenue par délétion de tout ou partie des gènes *hrp A1-C2*.

20

12. Souches *Xanthomonas campestris* essentiellement non phytopathogènes choisies parmi les souches BIOCAT 1016, BIOCAT 1017, BIOCAT 1019, BIOCAT 1021 et BIOCAT 1022, déposées à la CBS respectivement sous les numéros CBS 101940, CBS 101941, CBS 101942, CBS 101943 et CBS 101944.

25

13. Souche *Xanthomonas* selon l'une des revendications 4 à 13, caractérisée en ce que l'exopolysaccharide est une gomme xanthane.

30

14. Plasmide pRPA-BCAT 140 utilisé pour la fabrication de la souche selon les revendications 9 à 13.

15. Procédé de préparation d'une souche selon l'une quelconque des revendications 7 à 13, caractérisé en ce qu'elle est obtenue par

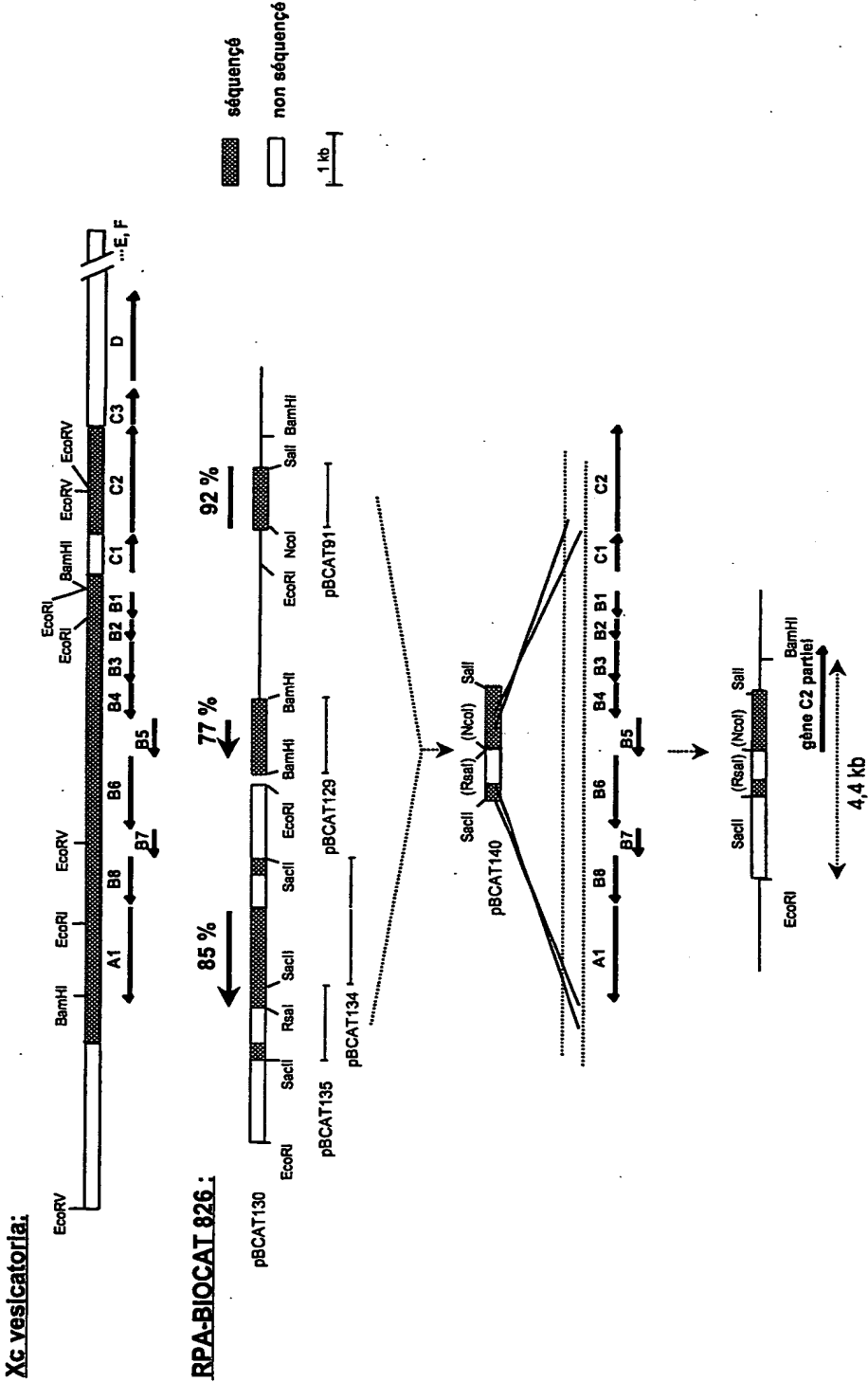
recombinaison homologue avec un plasmide comprenant une délétion de tout ou partie des gènes *hrp* ou *hrc*.

5 16. Procédé de préparation d'exopolysaccharide bactérien, notamment de gomme xanthane, caractérisé en ce que l'on cultive une souche bactérienne, le cas échéant, du genre *Xanthomonas*, de préférence l'espèce *Xanthomonas campestris* selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, dans des conditions permettant la production d'exopolysaccharide dans le milieu de fermentation.

10 17. Acide nucléique caractérisé en ce qu'il comprend la séquence nucléotidique SEQ ID n° 3.

15 18. Acide nucléique caractérisé en ce qu'il comprend la séquence nucléotidique SEQ ID n° 6.

19. Acide nucléique caractérisé en ce qu'il comprend la séquence nucléotidique SEQ ID n°7.



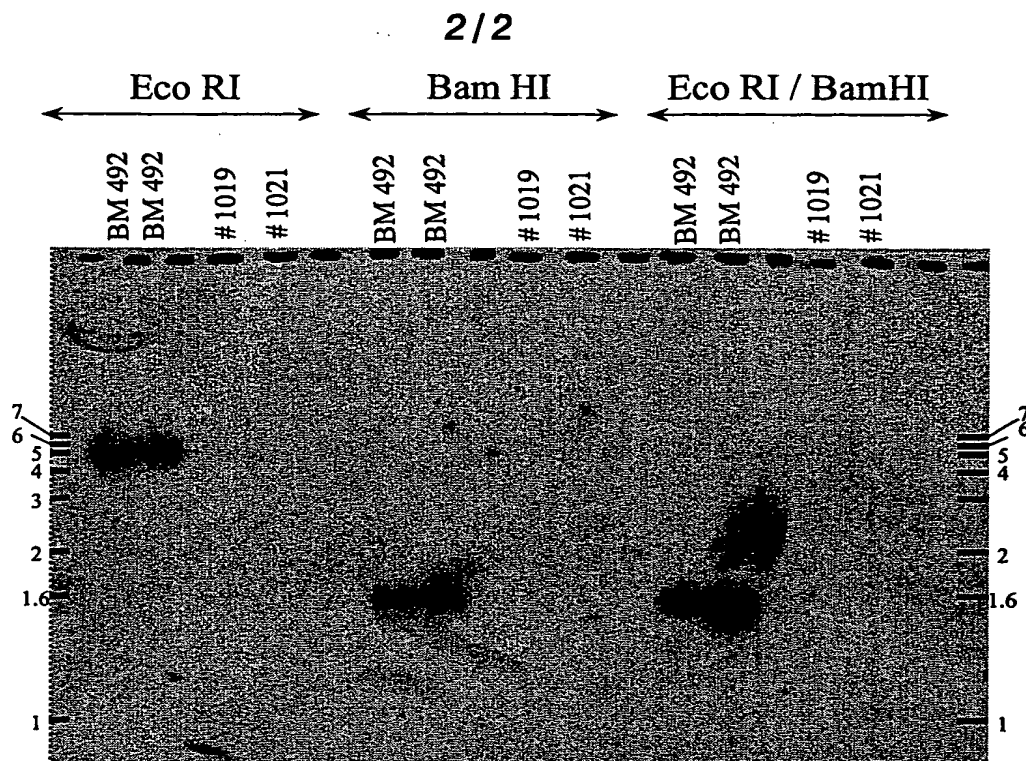


FIG.2

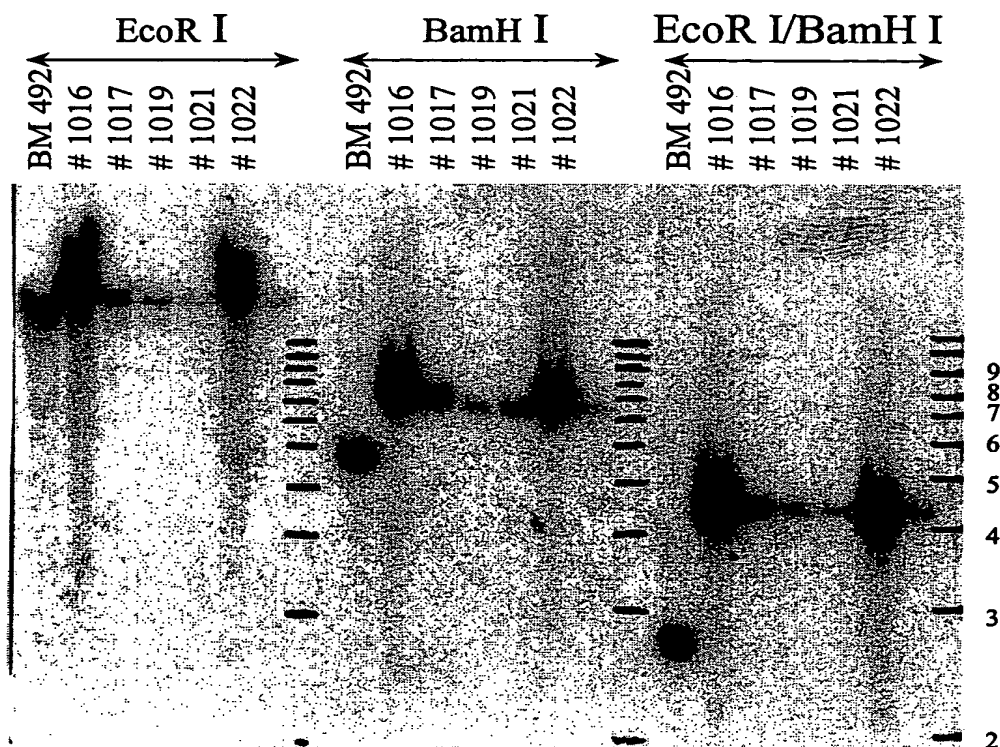


FIG.3

